

24.12.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 1 月 1 6 日
Date of Application:

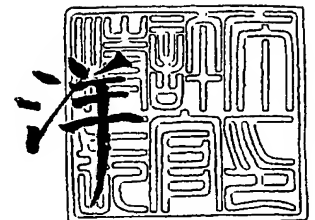
出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 0 8 8 6 2
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 0 0 8 8 6 2]

出 願 人 日 本 プ ロ ポ リ ス 株 式 会 社
Applicant(s):

2 0 0 5 年 2 月 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 NP-1932
【提出日】 平成16年 1月16日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 31/00
【発明者】
 【住所又は居所】 栃木県黒磯市下厚崎字東原 5 番地 4 5 2 日本プロポリス株式会社
 那須工場内
 【氏名】 緑川 淑
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県富山市五艘 1 3 5 7 - 1 7
 【氏名】 門田 重利
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県船橋市宮本 8 - 2 2 - 1 9
 【氏名】 松繁 克道
【特許出願人】
 【識別番号】 591144707
 【氏名又は名称】 日本プロポリス株式会社
 【代表者】 菅 澄子
【代理人】
 【識別番号】 100080850
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 中村 静男
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 006976
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 9718077

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

水と、有機溶剤と、乳化剤を含むと共に、p-クマリン酸、3, 4-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸、3, 5-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸、4-ヒドロキシ-3-プレニルケイ皮酸および3, 5, 7-トリヒドロキシ-4'-メトキシフラボノールを主要有効成分として含むことを特徴とする天然物由来の活性酸素消去剤。

【請求項 2】

さらに、3, 5-ジプレニル-4-ヒドロキシケイ皮酸、カエムフェライド、ベツレトール、クロロゲン酸、エルマニン、クリシン、カフェー酸、カエムフェロールおよびバニリンを有効成分として含む請求項 1 に記載の天然物由来の活性酸素消去剤。

【請求項 3】

有機溶剤が、分子中に水酸基 2 個以上を有する多価アルコール系化合物である請求項 1 または 2 に記載の天然物由来の活性酸素消去剤。

【請求項 4】

乳化剤が、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、レシチン類およびサポニン類の中から選ばれる少なくとも 1 種である請求項 1、2 または 3 に記載の天然物由来の活性酸素消去剤。

【請求項 5】

請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の活性酸素消去剤を含むことを特徴とする食品。

【請求項 6】

請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の活性酸素消去剤を含むことを特徴とする化粧品。

【書類名】明細書

【発明の名称】天然物由来の活性酸素消去剤およびその用途

【技術分野】

【0001】

本発明は、天然物由来の活性酸素消去剤およびその用途に関する。さらに詳しくは、本発明は、有効成分としてフラボノイド類やヒドロキシケイ皮酸誘導体などを含み、食品用や化粧品用などとして有用な天然物由来の活性酸素消去剤、並びに該活性酸素消去剤を含む食品および化粧品に関するものである。

【背景技術】

【0002】

酸素は生体にとって代謝によるエネルギーの産生など、生命の維持には必須な物質であるが、生体内外での諸反応系、すなわち一部の免疫反応や紫外線・放射線照射等により反応性に富んだ活性酸素種（スーパーオキシドアニオン： O_2^- 、過酸化水素： H_2O_2 、ヒドロキシルラジカル： $OH\cdot$ 、一重項酸素： 1O_2 等）やフリーラジカルを産生する。これらの活性酸素種やフリーラジカルは、例えばある免疫反応においては侵入した細菌等の異物を不活性化することには役に立つ一方で、生体成分と反応して脂質の過酸化、蛋白質や核酸の変性を引き起こし、種々の疾病や老化の促進の原因となることが知られている。特に皮膚は、身体の外層にあるために、紫外線や放射線等の外部要因により発生する活性酸素種やフリーラジカルの影響を受け易く、これらが皮膚で過剰に産生すると、ラジカル反応による過酸化脂質の生成やシミ、ソバカス等の皮膚の異常な色素の産生が増強されることが知られている。

【0003】

生体内で種々の原因により生じたスーパーオキシドアニオン O_2^- は、酵素スーパーオキシドディスムターゼ（以下SODと略記する）により H_2O_2 に変換され、さらに H_2O_2 は酵素カタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼの作用によって水と酸素とに分解される。これらの酵素に加えて生体内にはビタミンCやビタミンE等の食品由来の抗酸化物質が存在し、これらが生体内のラジカル反応や酸化反応を抑制するネットワークを形成して活性酸素やフリーラジカルによる諸障害の防御にあたると考えられている。しかし、周囲ならびに生体内の環境の変化、例えば細菌やウイルス等による感染、食物の摂取状態や栄養状態の変化、紫外線の過剰な照射、周囲から受ける種々のストレスおよび加齢・老化等により上記のネットワークのバランスが崩れると、生体内で産生される活性酸素やフリーラジカルの代謝バランスが崩れ、結果として過酸化脂質量の増加、皮膚炎、シミ、シワ、湿疹、ソバカス等の美容上の障害となる諸症状が現れ、さらには関節リウマチ、動脈硬化、糖尿病、肝炎、腎炎や癌等の疾病が引き起こされることが知られている。

【0004】

また、人が摂取する食品や食品添加物についても、紫外線や放射線の作用により発生する活性酸素やフリーラジカルによる酸化や通常の酸化によって、それらに含まれている脂質その他の成分の過酸化や変性が起こり、それら酸化、変性物の摂取は健康上好ましくないうことは周知のことである。さらに、化粧品、皮膚外用剤に配合されることがある不飽和脂質を含む天然油脂や界面活性剤の中には、紫外線等の作用によって酸化を受け易いものがあることが知られており、結果として変色や異臭の発生等の好ましくない現象が起こることが多い。このような酸化を受け易い化粧品基剤の使用によって、前述の諸原因によって皮膚に生ずる脂質過酸化物の量が増大し、上記の美容上の障害となる諸症状が増幅されることは容易に推測されることである。

【0005】

従来、化粧品、食品、食品添加物および飼料に添加されている抗酸化剤としては、ジブチルヒドロキシルエン（BHT）、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）、エトキシキン等の合成抗酸化剤の他、アスコルビン酸やビタミンE等の天然抗酸化剤がある。上記の合成抗酸化剤は、抗酸化効果は優れているが、発癌性等の安全性に問題があるものがあり、その使用については制限されているものもある。一方、上記の天然由来の抗酸化剤は

、安全性については評価されるものの、抗酸化効果は合成抗酸化剤よりもかなり劣るとい
う欠点がある。

【0006】

近年、このような状況下で活性酸素・フリーラジカル消去効果や抗酸化効果を有する物
質もしくは組成物の香粧品科学的、食品科学的また薬学的見地からの探索が活発に行われ
、その結果、かなりの数の活性酸素・フリーラジカル消去剤や抗酸化剤が知られるよう
になった。例えば、オウゴンに含まれるフラボノイド成分であるバイカレインを含有する活
性酸素消去剤（例えば、特許文献1参照）、クローブ油またはその成分であるデハイドロ
ジオイゲノールからなる活性酸素消去・除去剤（例えば、特許文献2参照）、クルミ殻抽
出物を有効成分とする活性酸素消去剤（例えば、特許文献3参照）などが提案されている
。

【0007】

一方、従来より、天然の抗菌性物質や健康増進物質としてプロポリスが知られている。
このプロポリスは、ミツバチが巣の保全のために作る濃緑色～茶褐色の粘着性物質であり
、ミツバチが樹木より採取したガム質・樹液・植物色素系物質・香油等の集合体に、自身
の分泌物・蜜蝋等を混合して作られる。該プロポリスについては、抗腫瘍活性、抗酸化活
性、抗炎症活性、抗菌活性など様々な生物活性が報告されている。生理活性を有する化合
物群としてはケイ皮酸誘導体、フラボノイド類、エステル類や、その他のフェノール性化
合物群等があげられ、亜熱帯産のプロポリスにおいては加えてテルペン類の存在が報告さ
れている。

【特許文献1】特公平4-34969号公報

【特許文献2】特開平3-227938号公報

【特許文献3】特開平7-69912号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、活性酸素やフリーラジカル消去能が高く、かつ人体に対して安全であって、
各種用途に有用な天然物由来の活性酸素消去剤およびその用途を提供することを目的とす
るものである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、前記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、例えばプロポリス原
塊粉末の抽出処理で得ることのできる、フラボノイド類、ヒドロキシケイ皮酸誘導体、そ
の他フェノール性化合物などの複数種の有効成分を含む天然物由来の物質により、その目
的を達成し得ることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- (1) 水と、有機溶剤と、乳化剤を含むと共に、p-クマリン酸、3,4-ジ-*O*-カフ
ェオイルキナ酸、3,5-ジ-*O*-カフエオイルキナ酸、4-ヒドロキシ-3-プレニル
ケイ皮酸および3,5,7-トリヒドロキシ-4'-メトキシフラボノールを主要有効成
分として含むことを特徴とする天然物由来の活性酸素消去剤、
- (2) さらに、3,5-ジプレニル-4-ヒドロキシケイ皮酸、カエムフェライド、ベツ
レトール、クロロゲン酸、エルマニン、クリシン、カフェー酸、カエムフェロールおよび
バニリンを有効成分として含む上記(1)項に記載の天然物由来の活性酸素消去剤、
- (3) 有機溶剤が、分子中に水酸基2個以上を有する多価アルコール系化合物である上記
(1)または(2)項に記載の天然物由来の活性酸素消去剤、
- (4) 乳化剤が、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、プロピレ
ングリコール脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、レシ
チン類およびサポニン類の中から選ばれる少なくとも1種である上記(1)、(2)また
は(3)項に記載の天然物由来の活性酸素消去剤、
- (5) 上記(1)～(4)項のいずれか1項に記載の活性酸素消去剤を含むことを特徴と

する食品、および

(6) 上記 (1) ~ (4) 項のいずれか 1 項に記載の活性酸素消去剤を含むことを特徴とする化粧料、
を提供するものである。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、活性酸素やフリーラジカル消去能が高く、かつ人体に対して安全であって、各種用途に有用な天然物由来の活性酸素消去剤、並びに該活性酸素消去剤を含む食品および化粧料を提供することができる。

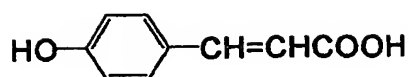
【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

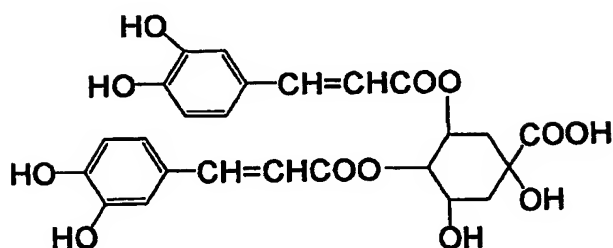
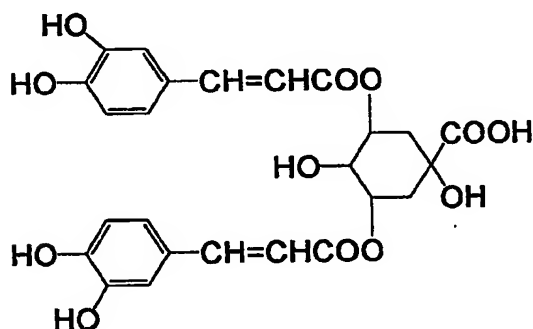
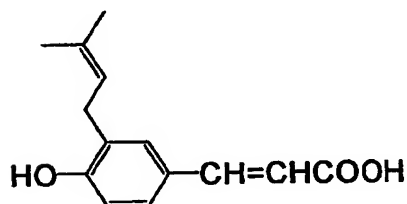
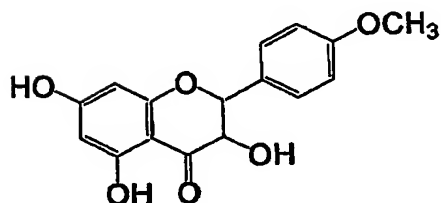
本発明の活性酸素消去剤は、水と、有機溶剤と、乳化剤を含むと共に、下記の構造を有する、*p*-クマリン酸 (*p*-coumaric acid)、3, 4-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸 (3, 4-di-*O*-caffeoylquinic acid)、3, 5-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸 (3, 5-di-*O*-caffeoylquinic acid)、4-ヒドロキシ-3-プレニルケイ皮酸 (4-hydroxy-3-prenylcinnamic acid) および 4'-メトキシ-3, 5, 7-トリヒドロキシフラバノール (4'-methoxy-3, 5, 7-trihydroxyflavanol) を主要有効成分として含む天然物由来のものである。

【0012】

【化1】



p-クマリン酸

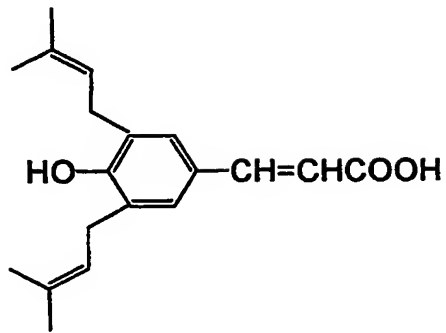
3, 4-ジ-0-
カフェオイルキナ酸3, 5-ジ-0-
カフェオイルキナ酸4-ヒドロキシ-3-
プレニルケイ皮酸4'-メトキシ-3, 5, 7-
トリヒドロキシフラバノール

【0013】

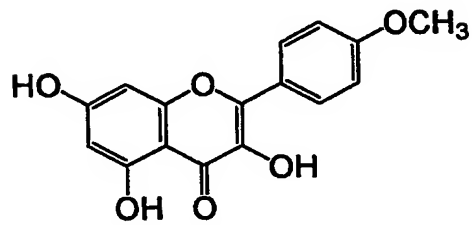
本発明の活性酸素消去剤は、さらに有効成分として、下記の構造を有する、3, 5-ジプレニル-4-ヒドロキシケイ皮酸 (アーテピリンC) [3, 5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillinC)]、カエムフェライド (kaempferide)、ベツレトール (betuletol)、クロロゲン酸 (chlorogenic acid)、エルマニン (ermanin)、クリシン (chrysin)、カフェー酸 (caffeic acid)、カエムフェロール (kaempferol) およびバニリン (vanillin) を含むことができる。

【0014】

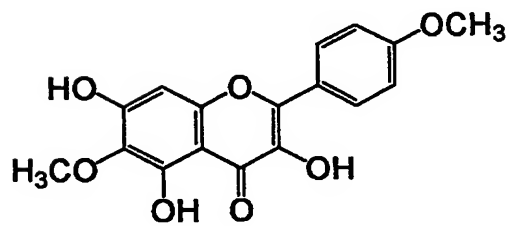
【化2】



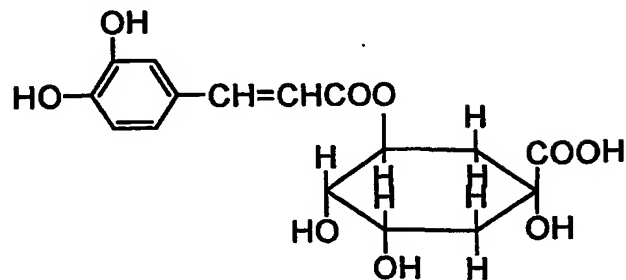
3, 5-ジプレニル-4-ヒドロキシ
ケイ皮酸



カエムフェライド



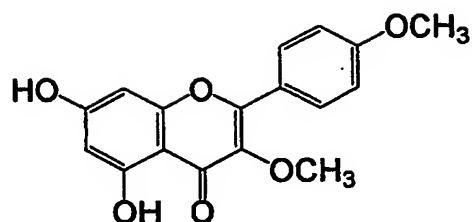
ベツレトール



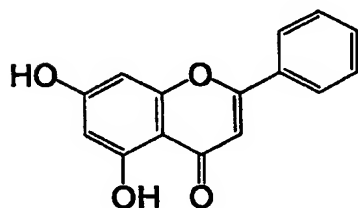
クロロゲン酸

【0015】

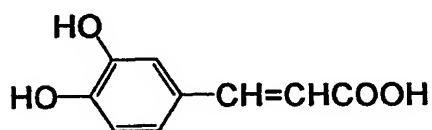
【化3】



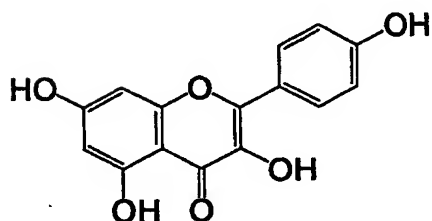
エルマニン



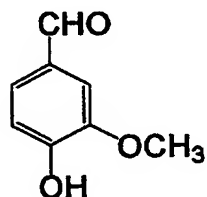
クリシン



カフェー酸



カエムフェロール



バニリン

【0016】

なお、カエムフェライドは、4'-メトキシ-3, 5, 7-トリヒドロキシフラボン、ベツレトールは、4', 6-ジメトキシ-3, 5, 7-トリヒドロキシフラボン、エルマニンは、3, 4'-ジメトキシ-5, 7-ジヒドロキシフラボン、クリシンは、5, 7-ジヒドロキシフラボン、カエムフェロールは、3, 4', 5, 7-テトラヒドロキシフラボンのことである。

【0017】

本発明の活性酸素消去剤に含まれる有機溶剤としては、分子中に水酸基2個以上を有する多価アルコール系化合物が好ましく、具体的には、グリセリン、エチレングリコール、

ジエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、グリセリンのアルキレンオキサイド付加物、エチレングリコールのアルキレンオキサイド付加物、プロピレングリコールのアルキレンオキサイド付加物、グルコノデルタラクトン、さらにはキシリトール、ヘキシトール、マンニトール、ソルビトールなどの糖アルコール等を挙げることができる。これらは1種含まれていてもよく、2種以上含まれていてもよいが、該活性酸素消去剤を食品用途に用いる場合には、特にグリセリンおよび各種の糖アルコールが好適である。

【0018】

一方、乳化剤としては、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、レシチン類およびサポニン類などを例示することができる。

前記グリセリン脂肪酸エステルとしては、例えばグリセリン＝モノラウレート、グリセリン＝モノパルミテート、グリセリン＝モノステアレート、グリセリン＝モノオレエート、グリセリン＝モノリノレート、グリセリン＝モノリシノレートなどを挙げることができる。

【0019】

ポリグリセリン脂肪酸エステルとしては、例えばジグリセリン＝モノラウレート、ジグリセリン＝モノパルミテート、ジグリセリン＝モノステアレート、ジグリセリン＝モノオレエート、ジグリセリン＝モノリノレート、ジグリセリン＝モノリシノレート、テトラグリセリン＝モノラウレート、テトラグリセリン＝ジラウレート、テトラグリセリン＝モノパルミテート、テトラグリセリン＝ジパルミテート、テトラグリセリン＝モノステアレート、テトラグリセリン＝ジステアレート、テトラグリセリン＝モノオレエート、テトラグリセリン＝ジオレエート、テトラグリセリン＝モノリノレート、テトラグリセリン＝ジリノレート、テトラグリセリン＝モノリシノレート、テトラグリセリン＝ジリシノレート、テトラグリセリン＝モノベヘネート、テトラグリセリン＝ジベヘネート、ペンタグリセリン＝モノラウレート、ペンタグリセリン＝ジラウレート、ペンタグリセリン＝モノパルミテート、ペンタグリセリン＝ジパルミテート、ペンタグリセリン＝モノステアレート、ペンタグリセリン＝ジステアレート、ペンタグリセリン＝モノオレエート、ペンタグリセリン＝ジオレエート、ペンタグリセリン＝モノリノレート、ペンタグリセリン＝ジリノレート、ペンタグリセリン＝モノリシノレート、ペンタグリセリン＝ジリシノレート、ペンタグリセリン＝モノベヘネート、ペンタグリセリン＝ジベヘネート、デカグリセリン＝モノラウレート、デカグリセリン＝ジラウレート、デカグリセリン＝トリラウレート、デカグリセリン＝モノパルミテート、デカグリセリン＝ジパルミテート、デカグリセリン＝トリパルミテート、デカグリセリン＝モノステアレート、デカグリセリン＝ジステアレート、デカグリセリン＝トリステアレート、デカグリセリン＝モノオレエート、デカグリセリン＝ジオレエート、デカグリセリン＝トリオレエート、デカグリセリン＝モノリノレート、デカグリセリン＝ジリノレート、デカグリセリン＝トリリノレート、デカグリセリン＝モノリシノレート、デカグリセリン＝ジリシノレート、デカグリセリン＝トリリシノレート、デカグリセリン＝モノベヘネート、デカグリセリン＝ジベヘネート、デカグリセリン＝トリベヘネート、デカグリセリン＝モノイソステアレート、デカグリセリン＝セスキイソステアレート、デカグリセリン＝ジイソステアレート、デカグリセリン＝トリイソステアレート、デカグリセリン＝モノ(12-ヒドロキシ)ステアレート、デカグリセリン＝ジ(12-ヒドロキシ)ステアレート、デカグリセリン＝トリ(12-ヒドロキシ)ステアレート等を挙げることができる。

【0020】

プロピレングリコール脂肪酸エステルとしては、例えばプロピレングリコール＝モノラウレート、プロピレングリコール＝モノパルミテート、プロピレングリコール＝モノステアレート、プロピレングリコール＝モノオレエート、プロピレングリコール＝モノリノレート、プロピレングリコール＝モノリシノレート、プロピレングリコール＝モノイソステアレート、プロピレングリコール＝モノ(12-ヒドロキシ)ステアレートなどを挙げる

ことができる。

【0021】

ソルビタン脂肪酸エステルとしては、例えばソルビタン＝モノラウレート、ソルビタン＝ジラウレート、ソルビタン＝モノパルミテート、ソルビタン＝ジパルミテート、ソルビタン＝モノステアレート、ソルビタン＝ジステアレート、ソルビタン＝モノオレエート、ソルビタン＝ジオレエート、ソルビタン＝モノリノレート、ソルビタン＝ジリノレート、ソルビタン＝モノリシノレート、ソルビタン＝ジリシノレート、ソルビタン＝モノベヘネート、ソルビタン＝ジベヘネート、ソルビタン＝モノイソステアレート、ソルビタン＝ジイソステアレート、ソルビタン＝モノ（12-ヒドロキシ）ステアレート、ソルビタン＝ジ（12-ヒドロキシ）ステアレート等が挙げられる。

【0022】

ショ糖脂肪酸エステルとしては、例えばショ糖＝モノラウレート、ショ糖＝ジラウレート、ショ糖＝モノパルミテート、ショ糖＝ジパルミテート、ショ糖＝モノステアレート、ショ糖＝ジステアレート、ショ糖＝モノオレエート、ショ糖＝ジオレエート、ショ糖＝モノリノレート、ショ糖＝ジリノレート、ショ糖＝モノリシノレート、ショ糖＝ジリシノレート、ショ糖＝モノイソステアレート、ショ糖＝ジイソステアレート、ショ糖＝モノ（12-ヒドロキシ）ステアレート、ショ糖＝ジ（12-ヒドロキシ）ステアレート等を挙げることができる。

【0023】

また、レシチン類としては、例えば大豆レシチンや他の植物レシチンなどを、サポニン類としては、例えばキラヤ抽出物やダイズサポニンなどを挙げることができる。

これらの乳化剤は、1種含まれていてもよく、2種以上含まれていてもよい。なお、前記乳化剤は、食品用として使用可能であるので、当該活性酸素消去剤を食品用途に用いる場合、含まれていてもかまわない。

本発明の活性酸素消去剤においては、水と前記有機溶剤と前記乳化剤の含有割合は、それらの合計量を100質量%とすると、通常水：5～50質量%、有機溶剤：45～94.9質量%および乳化剤：0.1～10質量%であり、好ましくは、水：5～30質量%、有機溶剤：65～94.5質量%および乳化剤：0.1～5質量%の範囲である。

本発明の活性酸素消去剤においては、前記有効成分の合計含有量は、当該活性酸素消去剤の用途に応じて適宜選定されるが、通常3～40質量%程度である。

【0024】

本発明の活性酸素消去剤は、例えば以下に示すように、プロポリス原塊を抽出処理することにより製造することができる。

原料のプロポリス原塊は、粉碎および抽出処理を効率的に行うために、15℃以下、好ましくは0～10℃程度の温度に保存したものをを用いることが望ましい。

まず、上記プロポリス原塊を粉碎機により粉碎処理する。この際、粉碎機に装着するスクリーンの孔径は、通常1～5mm径、好ましくは2～3mm径である。次いで、このプロポリス原塊粉碎物1質量部に対し、水と前記有機溶剤と前記乳化剤を前記の割合で含有する混合液からなる抽出溶媒を3～7質量部程度加える。抽出溶媒の使用量が3質量部未満ではプロポリス原塊粉碎物と抽出溶媒の粘性により、抽出作業効率が低下する原因となり、また7質量部を超えると有効成分の含有量が低下するおそれがある。

次に、50～90℃程度、好ましくは65～80℃の温度に加熱して30～120分間程度抽出処理を行う。抽出処理後、ろ過処理して固形分を取り除くことにより、本発明の活性酸素消去剤が得られる。

このようにして得られた本発明の活性酸素消去剤は、用途に適した濃度になるように、抽出溶媒を留去または添加して、濃度調整を行うことができる。さらに、必要により、凍結乾燥や噴霧乾燥を行い、粉末状で用いてもよい。

【0025】

本発明の活性酸素消去剤は、フラボノイド類、ヒドロキシケイ皮酸誘導体、その他フェノール性化合物など、親水性から疎水性まで幅広い成分を含んでおり、高い活性酸素・フ

リーラジカル消去能および抗酸化能を有し、例えば食品用途、化粧品用途、さらには飼料用途などに用いることができる。

本発明の活性酸素消去剤は、そのまま液状品として食品や化粧品などの組成物に配合するか、または予め該有効成分を製剤化したものを前記組成物に配合して、活性酸素消去効果および抗酸化効果を賦与して前記組成物の商品価値を高めることが可能である。

【0026】

製剤化の例としては、錠剤、カプセル剤、散剤、または顆粒剤の場合は、上記有効成分を澱粉、乳糖やマニトール等の賦型剤、カルボキシメチルセルロースやヒドロキシプロピルセルロース等の結合剤、結晶セルロースやカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤、タルクやステアリン酸マグネシウム等の潤沢剤、その他必要に応じて湿潤剤、着色剤や香料等を適宜組み合わせて処方することにより製剤化することができる。また、液剤としては、水性もしくは油性の乳濁剤やシロップ剤にすればよく、単シロップ、ソルビトール、メチルセルロースやカルボキシメチルセルロースナトリウム等の懸濁化剤、卵黄レシチン、ソルビタンモノ脂肪酸エステル、ラウロマクロゴールやヒマシ油等の乳化剤、その他必要に応じて防腐剤、保存剤や安定化剤等を適宜配合して製剤化することができる。軟膏の場合は、ワセリン、パラフィン、シリコン、プラスチックベース、植物油やロウ類等の疎水性基剤、精製ラノリン、カルボキシビニルポリマー、プロピレングリコールや1, 3-ブタジオール等の親水性基剤、ポリエタノールアミン等の乳化剤等を適宜配合して製剤化することができる。

【0027】

本発明はまた、前記活性酸素消去剤を含む食品および化粧料を提供する。

前記食品の形態としては、当該活性酸素消去剤をそのまま飲用する形態、あるいは味噌、醤油、マヨネーズ等の調味料、サラダオイル等の食用油に添加・混合する他、各種調理食品；デザート類、氷菓、飴、チューインガムや果汁等の菓子・飲料等を挙げることができる。これらの食品には、使用目的に応じた任意の成分を用いることができる。例えば氷菓や飲料の場合は、果汁、甘味料、酸味料、着色料や香料等を適宜配合することができる。本発明の有効成分の食品への添加量は、その形態により適宜変えればよい。

【0028】

一方、化粧品の形態としては種々のものを挙げることができ、例えばローション、乳液、クリームをはじめとして洗顔料、パック料、メーキャップ化粧料、頭髮化粧料、口唇化粧料、爪用化粧料、浴剤や制汗剤等が挙げられる。これらの化粧品には、使用目的に応じた任意の成分を用いることができ、例えばクリームの場合は、ワセリン、パラフィン、スクワランなどの疎水性基剤、ラノリン、プロピレングリコール、1, 3-ブタジオール等の親水性基剤、脂肪酸モノグリセライド類、ソルビタン脂肪酸エステル類等の乳化剤、防腐剤、顔料、香料、その他必要に応じて栄養剤、保湿剤、美白剤及び紫外線吸収剤等を常法に従って適宜配合することができる。同様に、その他の製品についても、その種類に応じた必要成分を適宜配合することができる。本発明の有効成分の化粧品への添加量は、その形態により適宜変えればよい。

また、本発明の活性酸素消去剤は、飼料に配合することもできる。飼料の形態としては、種々のものを挙げることができ、例えば家畜・家禽・魚類用の粉状、練り製品状またはペレット状の配合飼料を挙げることができる。これらの飼料には、使用目的に応じた任意の成分を用いることができ、例えば練り製品状の飼料の場合は、着色料や香料等を適宜配合することができる。本発明の有効成分の飼料への添加量は、その形態により適宜変えればよい。

【実施例】

【0029】

次に、本発明を実施例により、さらに詳細に説明するが、本発明は、これらの例によってなら限定されるものではない。

実施例 1

(1) プロポリス原塊抽出物

抽出溶媒として、(a) 水単独、(b) グリセリン単独、(c) 水10質量%とグリセリン90質量%の混合液および(d) 水10質量%とグリセリン89質量%と乳化剤(グリセリン=モノオレート)1質量%の混合液の4種を用いた。

プロポリス原塊(ブラジル産 *Baccharis dracunculifolia* 基源タイプ)の粉碎物25gに、上記の抽出溶媒(a)～(d)それぞれ200gを加え、攪拌しながら70℃で1時間抽出したのち、ろ過することにより、4種のプロポリス原塊抽出物(a)、(b)、(c)、(d)を得た。

(2) プロポリス食品規格成分含有量

上記(1)で得た4種のプロポリス原塊抽出物(a)、(b)、(c)、(d)について、財団法人日本健康・栄養食品協会プロポリス食品規格成分含有量測定法(平成7年改定)を適用し、吸光光度法($\lambda = 415 \text{ nm}$)を用い *Quercetin* (東京化成)当量を測定した。その結果を表1に示す。

また、財団法人日本健康・栄養食品協会プロポリス食品規格成分含有量測定法(平成13年改定)により、プロポリス食品規格成分含有量(質量%)を測定した。その結果を表1に示す。

(3) DPPHラジカル消去活性

上記(1)で得た4種のプロポリス原塊抽出物(a)、(b)、(c)、(d)について、抗酸化活性を評価するためにこれらの様々な濃度のエタノール溶液を作製し、同量の60マイクロモル/L濃度のDPPH(1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル)(和光純薬工業)エタノール溶液と混合し、30分後の吸光度($\lambda = 520 \text{ nm}$)を測定しそれぞれのプロポリス原塊抽出物のDPPHラジカル消去の IC_{50} 値を求めた。その結果を表1に示す。

【0030】

【表1】

表1

| 抽出溶媒の種類 | <i>Quercetin</i> 当量 (mg) | プロポリス規格 成分含有量 (質量%) | DPPHラジカル 消去活性 (% IC_{50}) |
|---------|-----------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| (a) | 180 | 5.3 | 0.057 |
| (b) | 321 | 9.7 | 0.021 |
| (c) | 298 | 9.4 | 0.020 |
| (d) | 353 | 11.0 | 0.020 |

【0031】

表1から、水と有機溶剤と乳化剤との混合液からなる抽出溶媒(d)を用いて得られたプロポリス原塊抽出物(d)(本発明の活性酸素消去剤)は、プロポリス食品規格成分含有量(*Quercetin*当量、質量%)が、他の抽出溶媒(a)、(b)、(c)を用いて得られたプロポリス原塊抽出物(a)、(b)、(c)よりも、高い値を示すことが分かる。

また、プロポリス原塊抽出物(d)は、プロポリス原塊抽出物(b)、(c)とほぼ同程度の高いDPPHラジカル消去活性を示すことが分かる。

(4) HPLCによる含有成分の分析

上記(1)で得られたプロポリス原塊抽出物(a)、(b)、(c)、(d)について、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析を行った。

HPLCの測定条件は、カラムCLC-ODS(150×6.0mm, i. d.)、カラム温度40℃、移動相はHPLC用の送液を用い、リニアグラジエント条件で開始時0.5%酢酸(和光純薬工業)ーメタノール(和光純薬工業)(70:30v/v)から3

0分後0.5%酢酸-メタノール(20:80 v/v) 30分以降保持、分析時間50分、流量1.0 ml/分、測定波長 $\lambda = 275 \text{ nm}$ である。

プロポリス原塊抽出物(a)、(b)、(c)、(d)は、HPLC用蒸留水(和光純薬工業)又はHPLC用メタノールに溶解(濃度:10 mg/ml)後、ザルトリウスミニザルト(0.45 μm , Goettingen, Germany)にてろ過後、ろ液10 μl をHPLC分析に用いた。

プロポリス原塊抽出物(a)、(b)、(c)および(d)のクロマトグラムを、それぞれ図1、図2、図3および図4に示すと共に、クロマトグラムの保持時間を指標に、対応するピークの面積およびピーク高さを表2に示す。

【0032】

【表 2】

表 2

| 化合物 | R.T. | 抽出物 (a) | | 抽出物 (b) | | 抽出物 (c) | | 抽出物 (d) | |
|-----|------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| | | ピーク 面積 | ピーク 高 | ピーク 面積 | ピーク 高 | ピーク 面積 | ピーク 高 | ピーク 面積 | ピーク 高 |
| a | 5.1 | 125290 | 6068 | 102569 | 4791 | 118675 | 5196 | 116167 | 5088 |
| b | 5.4 | 64218 | 3516 | 46914 | 2708 | 48786 | 3089 | 49486 | 3048 |
| c | 6.8 | 67983 | 2923 | 49105 | 2668 | 62464 | 3141 | 62474 | 3148 |
| d | 8.5 | 36815 | 2422 | 28592 | 2137 | 46542 | 2485 | 45092 | 2452 |
| e | 9.5 | 613175 | 63510 | 736791 | 79462 | 857236 | 90101 | 858366 | 90377 |
| f | 10.2 | 452055 | 26322 | 485907 | 31914 | 599082 | 35311 | 591450 | 35039 |
| g | 12.1 | 30527 | 2569 | 42026 | 4122 | 55639 | 4936 | 58157 | 5020 |
| h | 12.5 | 470342 | 31374 | 551542 | 39007 | 637013 | 42228 | 634979 | 41826 |
| i | 13.5 | | | 37333 | 2824 | 47636 | 3484 | 51477 | 3869 |
| j | 14.0 | | | 24799 | 2254 | 44366 | 3166 | 33045 | 3091 |
| k | 14.8 | | | 48871 | 4511 | 66827 | 4881 | 54559 | 5328 |
| l | 15.4 | | | 22556 | 1933 | 92674 | 2938 | 92312 | 2965 |
| m | 16.8 | 60700 | 3357 | 131557 | 9200 | 163546 | 10024 | 165998 | 10080 |
| n | 17.4 | | | 50201 | 4998 | 63077 | 5497 | 69077 | 6073 |
| o | 19.2 | 43709 | 3403 | 185670 | 19187 | 172834 | 16222 | 212072 | 20240 |
| p | 21.6 | | | 49904 | 2512 | 49549 | 1957 | 51501 | 2031 |
| q | 26.0 | | | 183990 | 13576 | 149566 | 10422 | 215098 | 15207 |
| r | 27.1 | | | 55024 | 5542 | 51095 | 4697 | 62991 | 5840 |
| s | 27.7 | | | 54329 | 5180 | 45326 | 3843 | 65628 | 5931 |
| t | 28.2 | | | 115784 | 11797 | 89560 | 8834 | 139402 | 14079 |
| u | 29.1 | | | 123128 | 5785 | 104342 | 3467 | 166476 | 5674 |
| v | 29.9 | | | 94387 | 8707 | 54525 | 2650 | 115563 | 7012 |
| w | 30.8 | | | 115012 | 8519 | 74578 | 6122 | 154801 | 10109 |
| x | 31.5 | | | 43888 | 2120 | 27047 | 1620 | 47771 | 2711 |
| y | 33.2 | | | 42724 | 4575 | 31290 | 3187 | 51312 | 5149 |
| z | 34.5 | | | 132448 | 14993 | 104284 | 11750 | 183655 | 20617 |
| AA | 39.4 | | | 154791 | 11187 | 126105 | 9084 | 232224 | 16489 |
| AB | 41.5 | | | 44139 | 2726 | 34879 | 2154 | 61039 | 3745 |

ピーク面積 30000 以下のデータは未記載。R.T.=保持時間 (分)

【0033】

化合物名は、a:クロロゲン酸 (chlorogenic acid)、c:カフェー酸 (caffeic acid)、d:バニリン (vanillin)、e:p-クマリン酸 (p-coumaric acid)、f:3, 5-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸 (3, 5-di-*O*-caffeoylquinic acid)、h:3, 4-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸 (3, 4-di-*O*-caffeoylquinic acid)、

o: 3, 5, 7-トリヒドロキシ-4'-メトキシフラボノール (3, 5, 7-trihydroxy-4'-methoxyflavonol)、p: カエムフェロール (kaempferol)、q: 4-ヒドロキシ-3-プレニルケイ皮酸 (4-hydroxy-3-prenylcinnamic acid)、s: クリシン (chrysin)、u: カエムフェライド (kaempferide)、z: 3, 5-ジプレニル-4-ヒドロキシケイ皮酸 (アーテピリンC) [3, 5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillinC)] である。

【0034】

図1～図4に示すように、プロポリス原塊抽出物(a)と比較して、プロポリス原塊抽出物(b)、(c)、(d)のクロマトグラムでは、明らかに移動相のメタノールの割合が上昇するにつれ、プロポリス原塊抽出物(a)のクロマトグラムには見られなかったピークが出現することが分かり、これにより、さらに個別のピークを用いての比較で、プロポリス原塊抽出物(b)、(c)、(d)のクロマトグラム上に疎水性を示すと考えられる化合物のピーク群の出現により、上記(2)および(3)で示された結果が裏付けられた。さらに詳しくは親水性の化合物a～hのピーク面積及びピーク高は、4種のプロポリス原塊抽出物においてほぼ同レベルか、プロポリス原塊抽出物(d)において優位な傾向が確認される。また、i～ABの化合物については、化合物m、o(3, 5, 7-トリヒドロキシ-4'-メトキシフラボノール)、z(3, 5-ジプレニル-4-ヒドロキシケイ皮酸)を除き、プロポリス原塊抽出物(b)、(c)、(d)のクロマトグラム上に明確に確認されるものであるが、プロポリス原塊抽出物(d)において優位な傾向が確認される。

【0035】

さらに詳しくは、保持時間15分以前に溶出する生理活性物質a(クロロゲン酸)、c(カフェー酸)、f(3, 5-ジ-*O*-カフェイルキナ酸)、h(3, 4-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸)などの測定値を変えずに、保持時間25分以降に溶出する有力な生理活性成分u(カエムフェライド)、z(3, 5-ジプレニル-4-ヒドロキシケイ皮酸)について、プロポリス原塊抽出物(b)、(c)と(d)の比較において、プロポリス原塊抽出物(d)に明らかに測定値の増加が確認できる。したがって、上記(2)における測定値の増加は、化合物u、zの増加が寄与するものと考えられ、プロポリス原塊抽出物(d)(本発明の活性酸素消去剤)は、親水性から疎水性まで、幅広い成分を含有し、ラジカル消去能を始め、有望な生理活性を有することが示唆される。

【産業上の利用可能性】

【0036】

本発明の活性酸素消去剤は、人体に対する安全性が高く、かつ高い活性酸素・フリーラジカル消去能および抗酸化能を有し、例えば食品用、化粧品用、飼料用などとして好適に用いられる。

【図面の簡単な説明】

【0037】

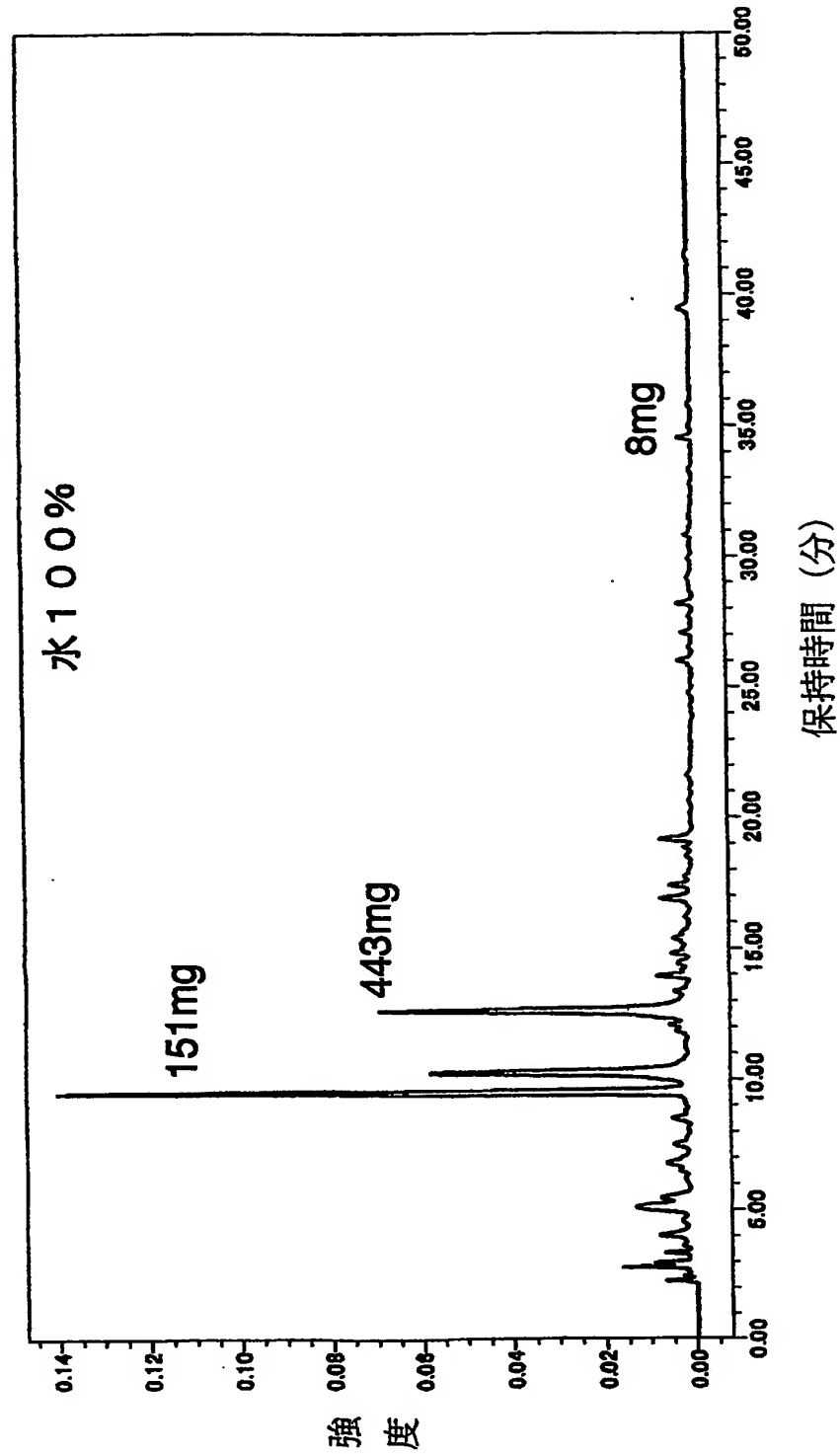
【図1】抽出溶媒として水を用いて得られたプロポリス原塊抽出物の1例の高速液体クロマトグラムである。

【図2】抽出溶媒としてグリセリンを用いて得られたプロポリス原塊抽出物の1例の高速液体クロマトグラムである。

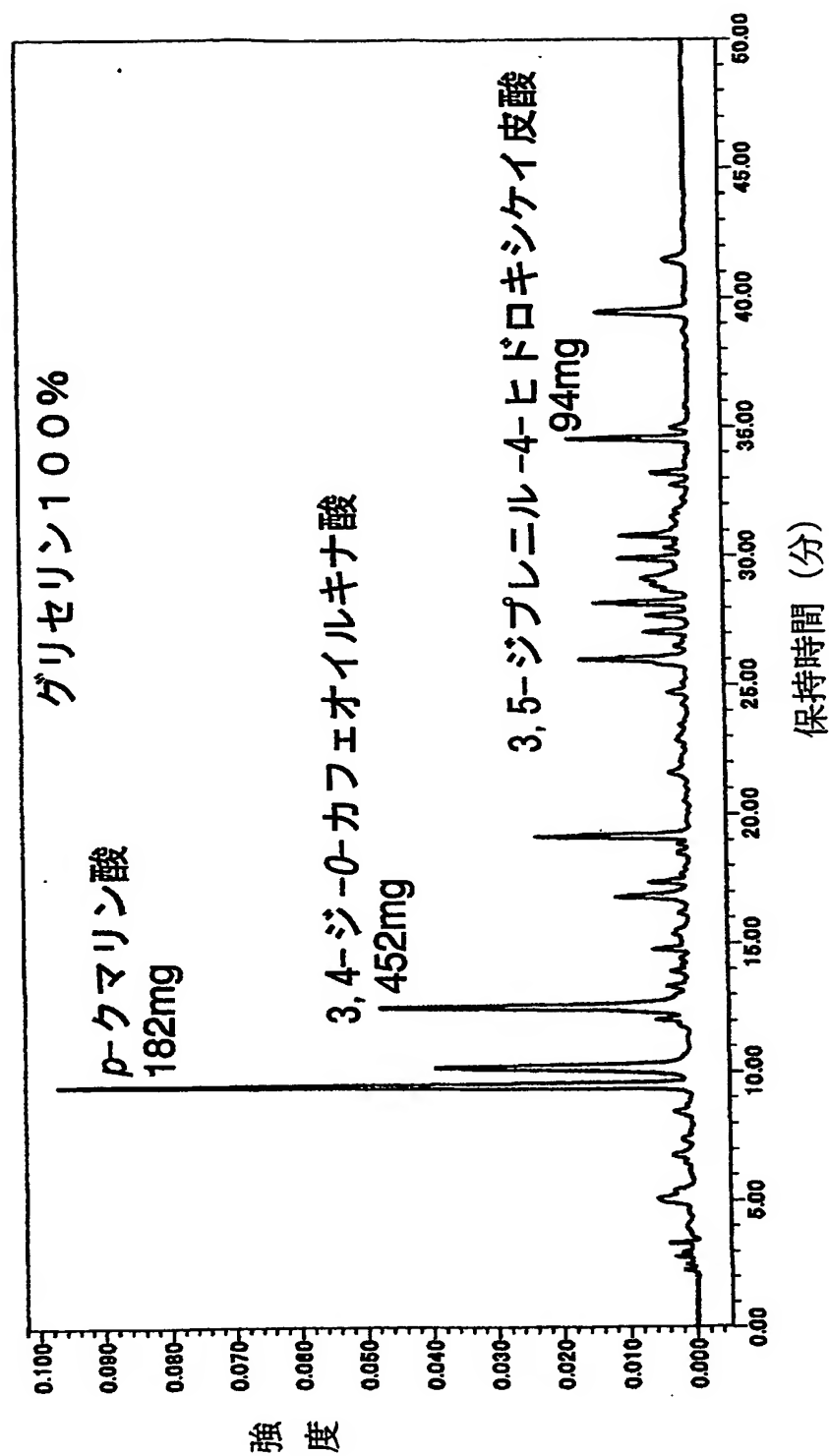
【図3】抽出溶媒として水とグリセリンの混合液を用いて得られたプロポリス原塊抽出物の1例の高速液体クロマトグラムである。

【図4】抽出溶媒として水とグリセリンと乳化剤の混合液を用いて得られたプロポリス原塊抽出物の1例の高速液体クロマトグラムである。

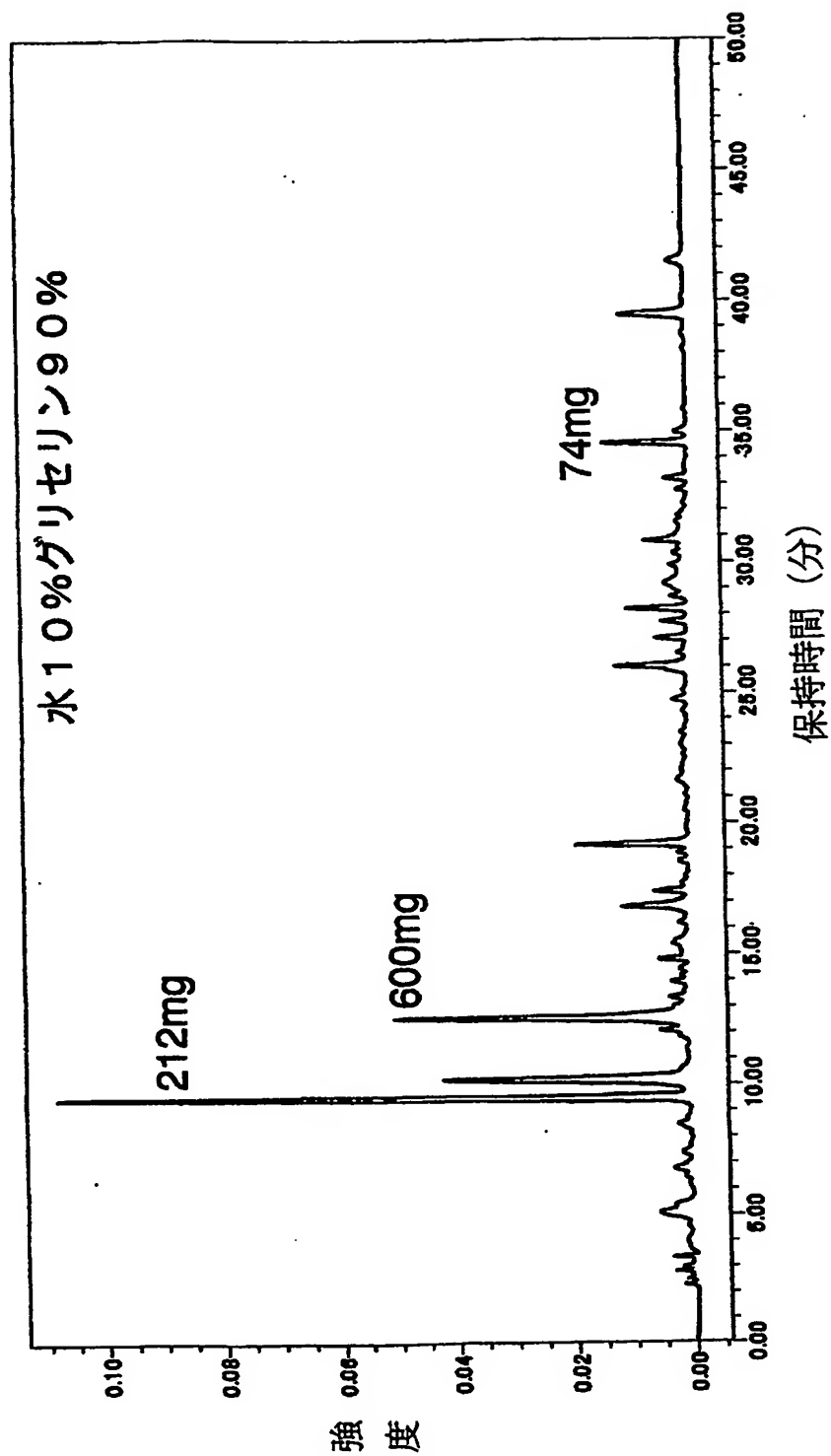
【書類名】 図面
【図 1】



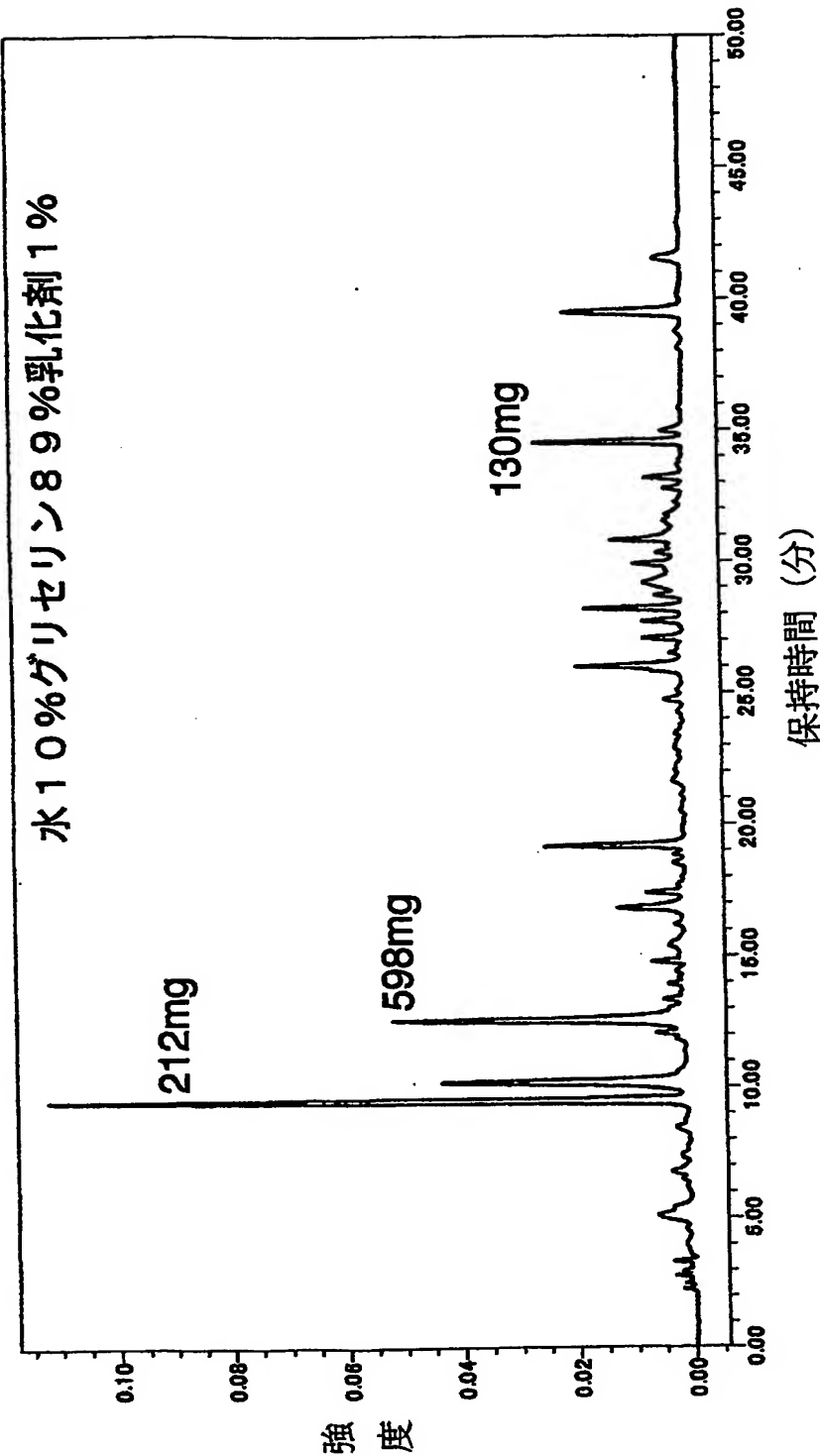
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 活性酸素やフリーラジカル消去能が高く、かつ人体に対して安全であって、各種用途に有用な天然物由来の活性酸素消去剤およびその用途を提供する。

【解決手段】 水と、有機溶剤と、乳化剤を含むと共に、p-クマリン酸、3,4-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸、3,5-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸、AA、4-ヒドロキシ-3-プレニルケイ皮酸および3,5,7-トリヒドロキシ-4'-メトキシフラボノールを主要有効成分として含む天然物由来の活性酸素消去剤、並びに該活性酸素消去剤を含む食品および化粧料である。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 0 8 8 6 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 1 1 4 4 7 0 7]

1. 変更年月日

1 9 9 9 年 1 月 1 3 日

[変更理由]

住所変更

住 所

栃木県黒磯市下厚崎字東原 5 番地 4 5 2

氏 名

日本プロポリス株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019773

International filing date: 24 December 2004 (24.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-8862
Filing date: 16 January 2004 (16.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 17 February 2005 (17.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse